

Factorial design에 의한 *Acetobacter xylinum* KJ1의 Bacterial cellulose 생산조건의 최적화

이 지 은 · 정 상 기 · 이 용 운 · †김 성 준
전남대학교 공과대학 환경공학과
(접수 : 2002. 3. 14., 게재승인 : 2002. 6. 8.)

Optimization for the Bacterial Cellulose Production of *Acetobacter xylinum* KJ1 by Factorial Design

Ji-Eun Lee, Sang-Ki Chung, Young-Woon Lee, and Seong-Jun Kim†
Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
(Received : 2002. 3. 14., Accepted : 2002. 6. 8.)

Acetobacter xylinum KJ1 efficiently producing bacterial cellulose(BC) in shaking culture was isolated from a rotten grape. The strain was used to investigate optimum operating conditions for increasing BC production and factorial design model was employed for the optimization. The results of experiments were statistically analyzed by SAS program. Reciprocal effects of each factors(carbon source concentration, shaking speeds(rpm), oxygen pressure, and CSL concentration) and culture condition of BC production were examined by getting regression equation of the dependent variable. Comparisons between experimental results and predicted results about BC concentration were done in total 24 experiments by combination of each factors using SAS program, and the correlation coefficients of BC concentration and BC yield were 0.91 and 0.81, respectively. The agitated cultures were performed in various operation conditions of factors which affected considerably to BC production in jar fermentor. The results showed that BC concentration was 11.67 g/L in 80 hours cultivation under the condition of carbon source concentration : shaking speeds(rpm) : oxygen pressure : CSL concentration = 4% : 460 rpm : 0.28 : 6%. On the other hand BC yield was 0.42 g/g in 80 hours cultivation under the condition of carbon source concentration : shaking speeds(rpm) : oxygen pressure : CSL concentration = 4% : 564 rpm : 0.21 : 2%. The BC production could be enhanced up to more than 2.4 times by factorial design. The result of a verifying experiment under the optimal conditions determined by the factorial design to the BC production showed that the model was appropriate by obtaining BC concentration of 11.47 g/L in the optimum condition

Key Words : factorial design, bacterial cellulose, *acetobacter xylinum*, optimization

서 론

셀룰로오스는 고등식물의 세포벽의 주성분으로 목질부의 대부분을 차지하는 천연 고분자 다당류로서 자연계에서는 석탄 다음으로 풍부하게 존재하는 유기화합물이다. 특히 셀룰로오스는 석탄과 달리 광합성에 의해 지속적으로 재생산되는 biomass로서, 다당류 중에서 분자량이 가장 큰 물질이다(1).

셀룰로오스는 화학약품에 대한 저항성도 강하고 미생물 침식의 저항성도 강해서 종이·의류의 원료로 사용되는 것 외에, 에테르 유도체는 레이온, 니트로에스테르는 화약의 원료로서 여러 가지로 응용된다. 현재 셀룰로오스는 목재, 펄프 및 섬유자원 등 공업적으로 중요한 자원으로 널리 이용되고 있으며 다양한 산업분야로의 그 이용이 확대되고 있는 추세이다(2,3). 셀룰로오스의 소비가 증가함에 따라 셀룰로오스의 원료로 사용되는 목재에 대한 수요 또한 높아지고 있으나 원료 공급과 환경문제로 인하여 제지 대체물질에 대한 연구가 필요한 실정이다. 따라서 미생물에 의해 생산되는 셀룰로오스(bacterial cellulose; BC)에 대한 관심이 높아지고 있다.

1886년 Brown에 의해 초산균이 셀룰로오스를 생산한다는 사실이 보고된 이래, 미생물에 의해 생산되는 셀룰로오스는

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1864, Fax : +82-62-530-0864

신소재로서 끊임없는 연구 대상이 되어왔다(4). 미생물 유래의 셀룰로오스는 식물 유래의 셀룰로오스와는 달리 리그닌이나 헤미셀룰로오스가 전혀 포함되지 않은 순수상태로 생산되며(5,6), 높은 기계적 강도와 고보습성, 고결정성 등의 BC만이 가지는 독특한 장점 때문에 음향, 방위, 의료 등의 다양한 산업분야에서 여러 가지 용도로 개발되고 있다(6).

일반적으로 BC는 정치배양 상태에서 배양액 표면에 얇은 pellicle 형태로 생산되지만, 정치배양은 인력과 배양시간 등의 산업적 측면에서 효율적이지 못하므로 교반배양을 통한 BC의 대량생산에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(7). 그러나 BC를 생산하는 대표적인 미생물인 *Acetobacter xylinum*은 교반배양에서 전단력에 의해 셀룰로오스를 생산하지 못하는 cellulose negative mutant(cel-)를 생성하기 때문에(8), 교반배양에 의해 BC를 대량생산하기 위해서는 자연계에서 유전적으로 안정한 균주를 선별하거나, 형질 전환 등의 분자유종 방법으로 교반배양에 안정한 균주의 개발이 선행되어야 한다. 본 연구에서는 이전의 연구(9)를 통해 본 실험실에서 분리한 교반배양에 비교적 안정한 균주인 *A. xylinum* KJ1을 사용해 BC 생산을 위한 최적조건을 조사하기 위한 실험을 수행하였다. BC 생산에 가장 큰 영향을 미친다고 생각되는 네 가지 factor(탄소원 농도, 교반속도, 산소분압, 질소원 농도)를 결정하고 각 factor의 조합에 따라 jar fermentor상에서 교반배양을 실시하여 BC 생산성을 최대화시키기 위해 factorial design model을 도입하여 최적 BC 생산조건을 결정하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

본 실험에 사용한 균주는 Son(9)이 자연계에서 분리, 동정한 *Acetobacter xylinum* KJ1이며 배양학적 특성 및 BC 생산량은 Table 1에 나타내었다. 전 배양 배지는 균주 접종물을 얻기 위하여 Hestrin & Schramm(HS)배지(glucose 20 g, bacto peptone 5 g, yeast extract 5 g, Na₂HPO₄ 2.7 g, citric acid monohydrate 1.15 g, distilled water 1L, pH 5.25)를 사용하였다. BC 생산을 위한 생산배지의 조성은 HS배지를 기본으로 하여, BC 수율 및 생산성을 높이기 위해 탄소원인 glucose를 fructose와 glucose를 3:1의 비율로 혼합한 혼합당으로 대체하였고, 질소원인 bacto peptone과 yeast extract는 corn steep

liquor(CSL; Sigma, U.S.A.)로 대체하였다.

균주배양

전배양은 HS배지 100 mL가 들어 있는 500 mL 플라스크에 *A. xylinum* KJ1을 접종하여 3일간 정치배양시켰다. 본배양은 10 L jar fermentor(BioG, Hanil R&D Co., Korea)에 생산배지 5 L를 넣고, 접종액으로 정치배양시킨 전배양액 1%를 접종하여 Table 2에 나타낸 각각의 실험 조건으로 30℃에서 80시간 배양하였다. 배양액의 pH는 2 N NaOH 및 2 N HCl을 이용하여 5.0으로 제어하였다.

Jar fermentor 내의 산소 공급 및 산소 분압(pO₂)의 측정

Jar fermentor로 공급되는 기체는 air pump를 통해 공급된 공기와 blender를 통해 공급된 순수산소가 혼합된 혼합기체이다. Air pump를 통해 공급된 공기는 air filter를 통과시켜 수분과 잡균을 제거하고 0.4 vvm으로 일정하게 공급하였고, bomb에서 공급된 산소는 99.9%의 순수 산소를 blender를 통해 air filter를 통과시켜 fermentor 내로 주입하였다. 주입된 혼합기체의 산소 분압은 다음 식(11)에 의하여 계산되었다.

$$pO_2 = \frac{p(21 \cdot V_a + cO \cdot v_o)}{(V_a + v_o)} \times \frac{1}{100}$$

여기서, *p* : operating pressure(atm)

V_a : air flow rate(ℓ/min)

cO : concentration of oxygen(% v/v) supplied by oxygen bomb

v_o : oxygen flow rate(ℓ/min)

The oxygen concentration of air was considered to be 21 %(v/v)

균체량 측정 및 BC 정량

Jar fermentor에서 배양시켜 생성된 BC를 homogenizer(HMZ-20ND, Matsushita co., Japan)로 완전히 분쇄시켜 얻어진 균질화된 용액을 균체량 측정 및 BC 정량에 사용하였다. 균체량을 측정하기 위해 균질화된 용액에 0.1%(w/v)의 cellulase(*Trichoderma reesei*, Sigma, U.S.A.)를 첨가한 후 50℃에서 2시간 반응시켜 BC를 완전히 분해 한 후 660 nm

Table 1. Comparison of the BC production of *A. xylinum* KJ1, BRC5, and BPR 2001

Strains	Cultivation time (hr)	BC concentration (g/L)	BC yield (g/g)	Reference
KJ1(stationary)	80	7.2	0.36	(9)
KJ1(agitation)	80	11.02	0.28	This work
<i>A. xylinum</i> BRC5	144	4.14	0.18	(10)
<i>A. xylinum</i> BPR 2001	73	7.7	0.18	(7)

Table 2. Standardization in three levels of factors

Factors	Symbols	Culture conditions				Standardized levels	
Carbon source conc. (%)	X1	1.6	2.0	4.0	-1	-0.833	+1
Shaking speed (rpm)	X2	350	500	600	-1	+0.4	+1
Oxygen pressure (atm)	X3	0.21	0.25	0.28	-1	+0.428	+1
CSL conc. (%)	X4	2.0	4.0	6.0	-1	0	+1

에서 분광광도계를 사용해 O.D.(Optical density)를 측정하였다. 이 용액을 GFC 여과지로 여과하여 여과전후의 무게차를 통해 균체량을 계산하고, 이후 OD와 균체량 사이의 관계식을 통해 OD를 측정함으로써 환산인자를 사용해 균체량으로 환산하였다.

BC 정량은 위의 균질화된 용액 100 mL를 취해 10,000×g, 30분간 원심분리 후 상등액은 버리고 pellicle만 취해 0.1 N NaOH 용액에 넣고 80℃에서 20~30분간 교반하여, 이 용액을 filter paper(Whatman, England)에 여과시킨 후 80℃ dry oven에서 8시간 건조시켜 데시게이터에서 방냉, 항량이 되었을 때 건조중량을 측정해 BC생산량을 측정하였다.

Residual reducing sugar와 glucose 정량

배양액 내에 잔존하는 total sugar 및 glucose 농도를 정량하기 위하여 배양액을 0.45 μm syringe filter(Whatman, England)로 여과시켜 균체와 셀룰로오스를 제거시켰다. Glucose 농도는 enzymatic method(Glucose-E Kit, Young Dong, Korea)에 의해 측정하였고, total sugar농도는 DNS method(12)를 사용해 측정하였다.

실험 인자(factor)의 설정

A. xylinum KJ1에 의한 BC 생산에 영향을 미친다고 생각되는 배양인자로서 탄소원 농도, 교반속도, 산소분압, 질소원 농도를 선택하였다. 이는 strain KJ1이 탄소원으로 glucose와 fructose가 혼합된 혼합당을 이용하여 셀룰로오스를 생산할 때 각각의 단일당을 탄소원으로 이용할 때 보다 셀룰로오스 생산성이 우수하다는 이전의 실험 결과(9)를 참고한 것이며, strain KJ1의 배양을 경제적으로 수행하기 위해 가격이 저렴한 질소원으로 CSL을 고려하였다. 또한, 일반적으로 *A. xylinum*은 호기상태의 정지배양에서 안정적으로 셀룰로오스를 생산하기 때문에 본 실험에서와 같이 교반 배양에서 셀룰로오스 생산을 최적화하기 위해서는 적절한 교반속도와 산소의 공급이 이루어져야 하므로 교반속도와 산소분압을 배양인자로서 선택하였다.

Flask상에서의 *A. xylinum* KJ1의 BC 생산에 관한 교반배양 조건은 HS배지에서 배양 온도 30℃, pH 5.0, 교반속도 150 rpm이 적절한 것으로 밝혀졌으나(9), fermentor상에서는 4개의 factor들의 상호작용으로 인하여 BC 생산이 flask와 다른 특성을 보이므로 Figure 1에서와 같은 fermentor상에서 기본실험을 수행하였다. 교반속도 500 rpm, 산소분압 0.21 atm, 질소원(CSL)농도 4%를 고정하고 탄소원 농도만을 변화시켰을 때(Figure 1의 Carbon)는 탄소원 농도가 증가함에 따라 BC 생산량도 증가하였으나, 수율은 2%가 가장 높았기 때문에 탄소원 농도 2%를 실험 중심값으로 선택하였다. 즉, Figure 1에서 세가지 factor를 고정하고 한가지 factor만을 변화시켜 얻은 수율과 BC 생산량을 비교한 data를 참고하여 본 실험의 각 factor들의 중심값으로 탄소원 농도 2%, 교반속도 500 rpm, 산소분압 0.25 atm, 질소원(CSL)농도 4%가 사용되었다. 이를 바탕으로 Table 2와 같이 각각의 실험인자(factor)를 설정하고, 이들 실험인자들의 조합에 의해 Table 3과 같이 24번의 실험을 수행하였다.

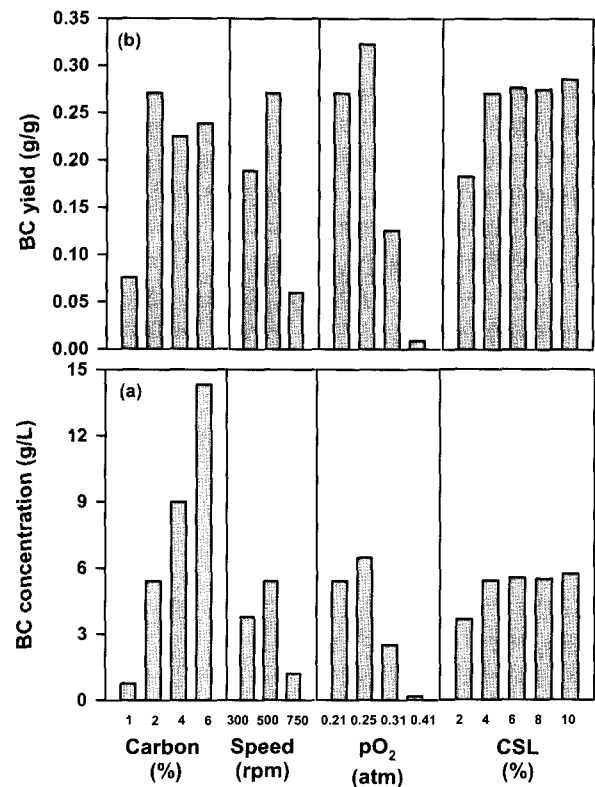


Figure 1. Comparisons of experimental results to BC concentration and BC yield in the jar fermentor cultures of various conditions. In the experimental conditions, when effect of one factor was examined, others three factors were fixed in the presumptive optimum values as follows : carbon source concentration of 2%, shaking speeds of 500 rpm, oxygen pressure of 0.21 atm and CSL concentration of 4%. And one factor was exchanged that carbon source concentration(%) of 1, 2, 4 and 6, shaking speeds(rpm) of 300, 500, and 750, oxygen pressure(atm) of 0.21, 0.25, 0.31 and 0.41 and CSL concentration(%) of 2, 4, 6, 8 and 10.

실험계획 및 통계분석

완전요인 분석에서는 본 연구에서와 같이 4개의 인자에 대한 3가지 수준을 실험하고자 하면 처리조합 당 81번의 요인 실험이 필요하다. 그러나 부분 배치법을 사용하면 각 인자별로 구하고자 하는 값에 가장 큰 영향을 미친다고 생각되는 몇 개의 조건만을 가지고 실험을 실행하여 구하고자 하는 최적 data를 얻을 수 있다. 따라서 본 실험에서는 탄소원 농도, 교반속도, 산소 분압 그리고 CSL 농도의 4가지 factor에 대한 부분요인 배치법을 사용한 factorial design model을 도입하여 최적의 BC 생산조건을 결정하였다(13-16).

각각의 실험인자 변화에 따른 BC 생산성은 다음과 같은 2차 다항식을 사용하여 통계적으로 분석하였다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j$$

Y : Response variable

β_0 : Intercept

β_i, β_j : Regression coefficients

X_i, X_j : Independent variables

Table 3. Experimental results under various culture conditions

Run No.	Experimental conditions				Experimental results		Predicted results	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	BC conc. (g/L)	BC yield (g/g)	BC conc. (g/L)	BC yield (g/g)
1	-1	-1	-1	-1	1.570	0.098	2.05	0.135
2	-1	-1	+0.428	0	3.434	0.215	2.34	0.156
3	-1	+0.4	-1	+1	2.885	0.180	4.05	0.221
4	-1	+0.4	+0.428	0	4.330	0.271	5.14	0.276
5	-1	+0.4	+1	+1	6.013	0.376	5.36	0.331
6	-1	+1	-1	0	4.113	0.257	3.65	0.232
7	-1	+1	+0.428	+1	2.170	0.136	2.66	0.189
8	-1	+1	+1	0	2.716	0.170	1.98	0.162
9	-0.833	-1	-1	+1	1.857	0.093	1.25	0.074
10	-0.833	-1	+1	0	1.735	0.087	2.29	0.126
11	-0.833	+0.4	-1	0	5.444	0.272	5.13	0.247
12	-0.833	+0.4	+0.428	0	4.834	0.242	5.15	0.236
13	-0.833	+0.4	+1	0	3.534	0.177	4.47	0.218
14	-0.833	+1	-1	0	4.034	0.202	3.64	0.196
15	-0.833	+1	+0.428	0	3.405	0.170	2.96	0.153
16	-0.833	+1	+1	-1	3.237	0.162	3.19	0.156
17	+1	-1	-1	0	2.672	0.067	3.14	0.073
18	+1	-1	+0.428	-1	3.202	0.080	2.76	0.049
19	+1	-1	+1	+1	9.166	0.229	9.79	0.256
20	+1	+0.4	-1	+1	9.194	0.230	8.86	0.222
21	+1	+0.4	+0.428	0	9.962	0.249	8.13	0.238
22	+1	+0.4	+1	+1	10.794	0.270	10.71	0.278
23	+1	+1	+0.428	0	3.835	0.096	6.03	0.162
24	+1	+1	+1	+1	8.303	0.208	7.71	0.152

실험결과는 SAS(Statistical analysis system)를 이용하여 통계적으로 분석하여 종속변수(탄소원 농도, 교반속도, 산소 분압 그리고 질소원 농도)에 대한 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 반응조건들에 대한 상호영향 및 최적 BC 생산을 위한 배양조건을 구하였다.

최적배양조건 결정값은 위 방정식의 Y값이 최대로 되는 지점을 3차원 그래프를 이용하여 구하였다. 3차원 그래프는 얻어진 각 계수(β_{ij})를 대입하여 X₁, X₂, X₃, X₄의 변수를 변화시켜 Y가 최대로 되도록 point를 찾아낸다. 이를 구체적으로 설명하면 구해진 각 계수(β_{ij})를 2차 다항식에 대입하고 Table 2에서 표준화한 값으로부터 우선 X₃, X₄를 고정하고 X₁, X₂를 스캔해서 Y가 최대로 되는 X₁, X₂를 구하고, 그 다음 구해진 X₁, X₂의 최적화된 값을 고정해서 X₃, X₄를 스캔하여 Y가 최대로 되는 X₃, X₄를 정한다. 여기에서 결정된 X₃, X₄의 조건에서 X₁, X₂의 최적조건을 구하였고, 다시 최적화된 X₁, X₂을 고정시켜 X₃, X₄를 결정하였다.

결과 및 고찰

Jar fermentor에서 A. xylinum KJ1의 성장특성

A. xylinum KJ1을 jar fermentor에서 80시간 동안 배양할 때의 대표적인 BC 생산에 관한 특성을 Figure 2에 나타내었다. 균체 농도와 BC 생산량은 24시간이 지난 후부터 60시간 까지 급격히 증가하였으며, 그 후에는 완만하게 증가하는 경향을 보였다. 배양 초기에 공급된 glucose 농도는 균체 농도가 증가하는 시점부터 급격하게 감소하여 배양 28시간 내에

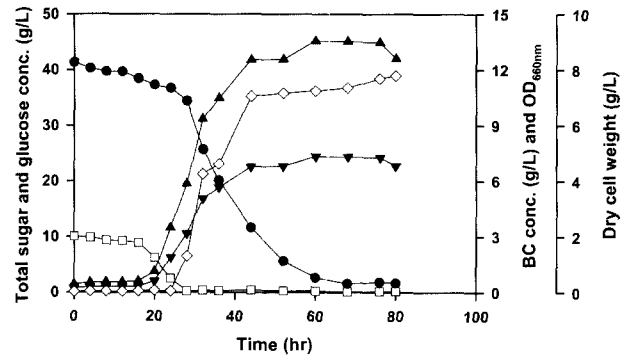


Figure 2. The changes of parameters related in BC production by A. xylinum KJ1 in optimum culture condition. The cultivation conditions were carbon source concentration of 4%, shaking speeds of 460 rpm, oxygen pressure of 0.28 atm and CSL concentration of 6%. Symbols: BC concentration(\diamond), OD660(\blacktriangle), glucose conc.(\square), total sugar conc.(\bullet), dry cell weight(\blacktriangledown).

완전히 소모되었다. 반면 total sugar 농도는 배양 초기에는 거의 일정하게 유지되는 것으로 보아, 혼합당내에 포함된 fructose는 glucose가 소모된 이후부터 비로소 급격하게 소모됨을 알 수 있었다. 이때 초기 total sugar 농도가 주입된 total sugar 농도보다 약간 높은 이유는 CSL에 포함되어 있는 탄소원의 영향으로 판단된다.

Data의 통계 분석

본 실험에 이용한 요인분석은 Table 2에서 보는 바와 같이

Table 4. Coefficients of regression equations for factorial design

Coefficients	Values estimated			
	BC concentration(g/L)		BC yield(g/g)	
	Estimated	Pr> t	Estimated	Pr> t
β_0 (Intercept)	6.21	0.035	0.15	0.163
β_1 (X_1)	1.41	0.009	-0.02	0.380
β_2 (X_2)	0.73	0.195	0.04	0.082
β_3 (X_3)	0.10	0.858	-0.01	0.609
β_4 (X_4)	0.59	0.398	-0.01	0.843
β_{12} (X_1X_2)	0.08	0.880	0.01	0.760
β_{13} (X_1X_3)	0.13	0.812	-0.01	0.537
β_{14} (X_1X_4)	1.10	0.143	0.00	1.000
β_{23} (X_2X_3)	-0.80	0.143	-0.04	0.095
β_{24} (X_2X_4)	-1.05	0.234	-0.06	0.091
β_{34} (X_3X_4)	1.01	0.252	0.07	0.070
β_{11} (X_1^2)	0.79	0.767	0.12	0.268
β_{22} (X_2^2)	-2.83	0.004	-0.11	0.004
β_{33} (X_3^2)	-0.60	0.544	-0.01	0.758
β_{44} (X_4^2)	0.83	0.368	0.03	0.347
R-square	0.9063		0.8123	
Prob>F	0.0046		0.0635	

X_1 =carbon source conc, X_2 =shaking speed, X_3 =oxygen pressure, X_4 = CSL conc.

표준화된 값을 사용하였다. 표준화된 값은 측정 단위가 다른 변수들의 동등한 비교가 가능하도록 해주며, 다중공선성을 제거하고자 사용하였다(13). BC 생산 결과를 다중회귀분석을 통하여 2차방정식의 계수 및 상관 계수를 결정하였으며, 그 결과를 Table 4에 나타내었다. BC생산량 및 수율에 관한 상관관계수(R^2) 값은 각각 0.91 및 0.81이었고, 또한 유의성 검증, 적합결여 및 잔차분석 등을 해석한 결과 모든 실험자료들이 독립변수인 탄소원 농도, 교반속도, 산소분압, CSL농도 변화에 따른 BC 생산량 및 수율에 대해 적절하게 설명되고 있음을 알 수 있었다.

각각의 독립변수에 관한 factor들의 상관성을 살펴보았는데, 탄소원 및 CSL 농도의 상관성과 교반속도, 산소분압의 상관성을 비교한 결과를 3차원 반응표면으로 분석한 결과를 Figure 4와 Figure 5에서 보여주고 있다. Figure 4 a)에서처럼 탄소원 농도와 CSL농도는 높을수록 BC 생산에 효과적으로 보였지만, 이에 반해 Figure 5 a)에서와 같이 total sugar에 대한 BC 생산량을 비교한 수율 면에서는 오히려 CSL 농도가 낮을수록 수율은 높은 것으로 예측되었다. 또한 교반속도 및 산소분압에 관한 상관성을 비교한 Figure 4 b)에서는 500 rpm 보다 약간 낮은 교반 속도와 공기중의 산소분압(공기 중의 산소분압 0.21 atm)보다 높은 분압으로 산소를 주입할 때 높은 BC 생산량을 얻을 수 있음을 보여주고 있다. Figure 5 b)의 수율면에서 교반속도와 산소분압의 상관성을 비교하면 교반 속도를 500 rpm보다 약간 증가시키고 특별한 산소주입 없이 일반적인 공기를 주입하여 산소 분압을 일반 공기 속의 분압 정도로만 유지하여도 BC의 생산 수율을 높일 수 있음을 알 수 있다. 여기서 *A. xylium* KJ1이 고농도의 산소 조건에서는 성장에 저해를 받아 BC 생산 수율이 감소한다는 현상은 재확인할 수 있었다.

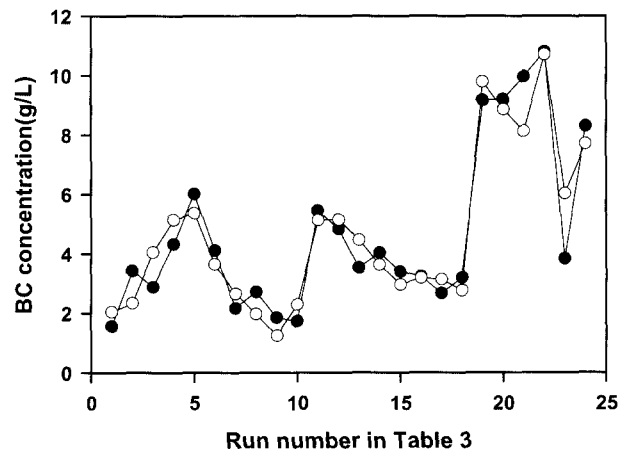


Figure 3. Comparisons of experimental results and predicted results to BC concentration in the various culture conditions. Correlation coefficient(R^2) was 0.91. Symbols: experimental results(●), predicted results(○)

최적조건 결정

전체 24개의 실험계획에서 각각의 factor의 조합에 의한 BC 생산성에 관한 결과 및 예측값을 Table 3에 나타내었다. 실험값과 factorial design에 의해서 얻어진 예측값 모두 Run No. 22에서 10.79 g/L과 10.71 g/L로 최대 BC 생산량을 보여주었다. 이때의 BC 생산을 위한 조건은 4% 탄소원, 교반속도 500 rpm, 산소분압 0.28 atm, CSL 농도 6%였다. 이들 실험값과 예측값의 결과를 비교하기 위한 그래프를 Figure 3에 나타내었고, 이때의 상관계수(R^2)는 0.91로 실험값과 예측값의 상호 신뢰도가 적절한 설득력을 가짐을 알 수 있었다.

Total sugar에 대한 BC 생산량을 비교한 수율 면에서는 Run No. 5에서 실험값과 예측값이 0.38 g/g과 0.33 g/g으로

Table 5. Predicted optimum conditions by factorial design

Factors	BC concentration (g/L)		BC yield (g/g)	
	Standardized levels	Culture conditions	Standardized levels	Culture conditions
X ₁	1.0	4.0	1.0	4.0
X ₂	-0.18	460	0.64	564
X ₃	1.0	0.28	-1.0	0.21
X ₄	1.0	6.0	-1.0	2.0
Predicted value		11.672		0.4244

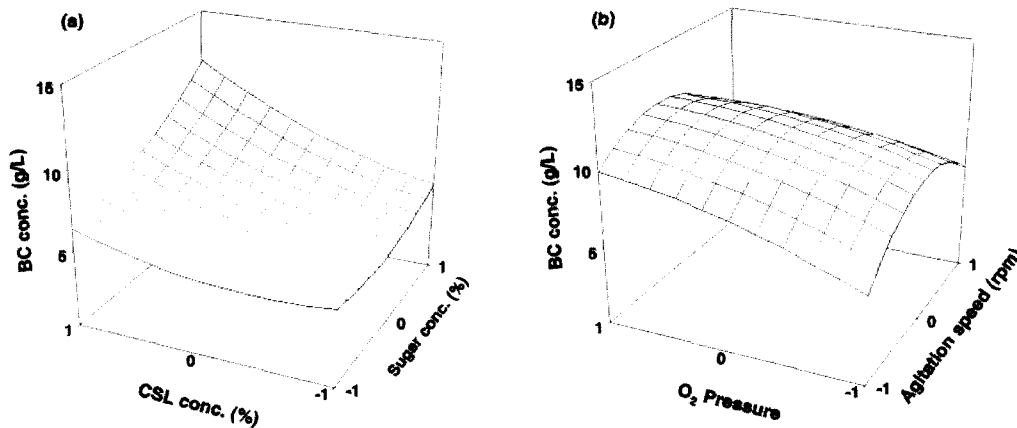


Figure 4. 3-D response surface in second scanning to the BC concentration according to the variation of carbon source concentration and CSL concentration(a) and shaking speed and oxygen pressure(b). The values of X₂ and X₃ were fixed as -0.18 and 1.00 (a) and X₁ and X₄ were fixed as 1.00 and 1.00 (b), respectively, as shown in Table 5.

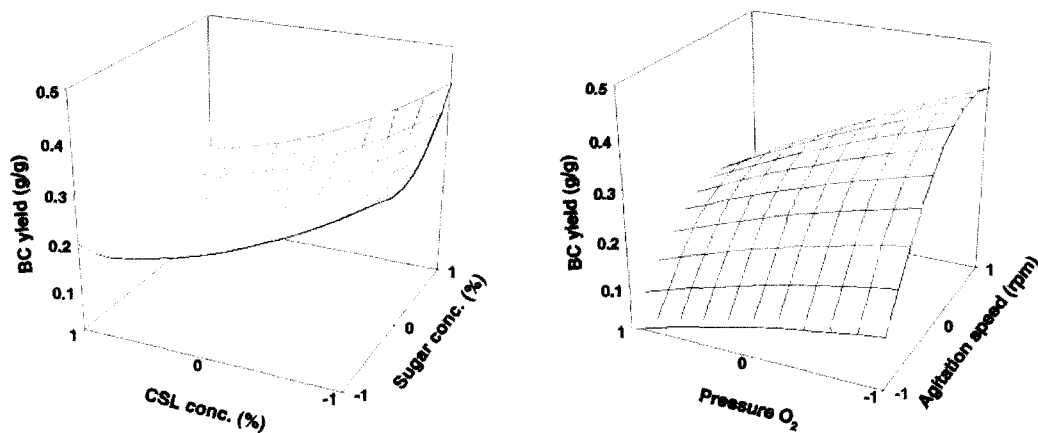


Figure 5. 3-D response surface in second scanning to the BC yield according to the variation of carbon source concentration and CSL concentration(a) and shaking speed and oxygen pressure(b). The values of X₂ and X₃ were fixed as 0.64 and -1.00 (a) and X₁ and X₄ were fixed as 1.00 and -1.00 (b), respectively, as shown in Table 5.

최대값을 보였다. 이때의 각 factor는 1.6% 탄소원, 교반속도 500 rpm, 산소분압 0.28 atm, CSL 농도 6%으로 상관계수 (R²)는 0.81이다.

A. xylinum KJ1을 이용한 BC 생산에서 가장 큰 영향을 주는 네 가지 factor에 관해 SAS 프로그램을 이용하여 최적값을 예측한 결과를 Table 5에 나타내었다. 최적 BC 생산을 위한 각 factor들은 탄소원 농도 4%, 교반속도 460 rpm, 산소분압 0.28 atm, CSL 농도 6%에서 11.67 g/L의 BC 생산이 가능한 것으로 예측되었다. 수율면에서 최적 배양조건이 탄소원 농도 4%, 교반속도 564 rpm, 산소분압 0.21 atm, CSL 농

도 2%일 때 최적의 수율 0.42 g/g를 얻을 수 있을 것으로 예측되었다. 결정된 최적 조건에서의 실증 실험 결과 11.47 g/L의 BC 생산량을 얻을 수 있었으며, 이는 fermentor상에서의 기본실험에서 얻은 4.83 g/L보다 2.4배 향상된 결과이다. 일본의 BPR과 국내의 대학에서 연구되고 있는 *A. xylinum* strain의 BC 생산량을 비교한 Table 1에서 보여주는 바와 같이 KJ1의 교반배양에 의한 BC 생산량이 strain BRC5나 BPR2001에 비해 월등함을 알 수 있다.

이상의 연구에서 최적 BC 생산을 위한 배양 조건이 결정되었고, 최적화에 관련된 자료들은 산업적으로 BC를 생산하

고자 할 때 유용하게 응용될 수 있을 것이다.

요 약

Factorial design model을 이용하여 *A. xylinum* KJ1의 BC생산을 위한 최적 배양조건을 결정하였다. 요인 분석을 위한 실험 계획법으로는 부분요인 분석을 통한 factorial model을 이용하였으며, 주요 실험인자인 탄소원 농도, 교반속도(rpm), 산소분압, CSL의 농도의 네 가지 factor의 영향에 의한 BC생산량의 변화를 측정하였다.

SAS 프로그램을 이용하여 전체 24개의 실험계획에서 각각의 factor의 조합에 의한 BC 생산성에 관한 결과 및 예측값을 비교한 결과 BC 생산량 면에서는 상관계수(R^2)가 0.91으로 이었고, 수율면에서는 상관계수(R^2)는 0.81이다. 최적 BC 생산을 위한 각 factor들이 탄소원의 농도 4%, 교반속도 460 rpm, 산소분압 0.28 atm, CSL 농도 6%일 때, 이때의 BC 생산량은 11.67 g/L로 예측되었다. 그리고 BC 생산 수율면에서 최적 배양조건이 탄소원 농도 4%, 교반속도 564 rpm, 산소분압 0.21 atm, CSL 농도 2%일 때 최적의 수율 0.42 g/g를 얻을 수 있을 것으로 예측되었다.

결정된 최적 조건에서의 실증 실험 결과 11.47 g/L의 BC 생산량을 얻을 수 있었으며, 이는 fermentor상에서의 기본실험에서 얻은 4.83 g/L보다 2.4배 이상 향상된 결과이다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-00350) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Byrom D. (1991), Microbial cellulose, p263-284, In D. Byrom(ed.) *Biomaterials*, Stockton Press, New York.
- Ko, Jung-Youn, K. S. Shin, B. D. Yoon, and W. Y. Choi (2002), Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* GS11, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**(1), 57-62.
- Son, Hong-Joo, O. M. Lee, Y. G. Kim, Y. K. Park, and S. J. Lee (2000), Characteristics of Cellulose Production by *Acetobacter* sp. A9 in Static Culture, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(6), 573-577.
- Brown, A. J. (1886), An acetic ferment which forms cellulose, *J. Chem. Soc.* **49**, 432-439.
- Rainer, J. and F. F. Luiz. (1998), Production and application of microbial cellulose, *Polym. Degrad. Stab.* **58**, 101-106.
- Yamanaka, S. and K. Watanabe. Applications of Bacterial Cellulose in Cellulosic Polymers, In R. Gillbert (ed), p207-215, *Cellulosic Polymers, Blends and Composites*, Hanser Inc., Cincinnati, OH, U. S. A.
- Toyosaki, H., T. Naritomi, A. Seto, M. Matsuoka, T. Tsuchida, and F. Yoshinaga (1995), Screening of bacterial cellulose producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture, *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1498-1502.
- Valla, S. and Kjosbakken (1982), Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*, *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1401-1408.
- Son, C. J. (2002), Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing Bacterial Cellulose in shaking and agitated culture, M. S. Thesis, Dept. of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju.
- Park, S. H., Y. K. Yang, J. W. Hwang, C. S. Lee, and Y. R. Pyun (1997), Microbial Cellulose Fermentation by *Acetobacter xylinum* BRC5, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**(6), 598-605.
- Kouda T, T. Naritomi, and F. Yoshinaga (1997), Effects of Oxygen and Carbon-Dioxide Pressures on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter* in Aerated and Agitated Culture, *J. Ferment. Bioeng.* **84**(2), 124-127.
- Miller G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic as reagent for the determination of reducing sugars, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Yoon S. J., B. D. Ye, S. H. Park, and E. Y. Lee (2000), Optimization of cometabolic trichloroethylene degradation conditions by response surface analysis, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 393-397.
- Kim S. K., S. J. Oh, and S. J. Lee (1994), Optimizing conditions for the growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. HY 449 using response surface methodology, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 522-530.
- Oh K. K., S. W. Kim, Y. S. Jeong, and S. I. Hong (1996), Optimization of operation conditions for the hydrolysis of cellulose by response surface methodology, *Hwahak Konghak* **34**, 418-423.
- Kwak, K. O (2001), Optimization of CO₂ fixation condition of a chemoautotrophic microorganism, strain YN-1 by a factorial design, M. S. Thesis, Dept. of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju.